Dal Laboratorio Anatomo-Patologico dell' Istituto Psichiatrico di Reggio-Emilia

NUOVI METODI D' INDAGINE MICROSCOPICA

PER LO

STUDIO DI ALCUNE PARTICOLARITÀ DI STRUTTURA

DEI CENTRI NERVOSI

DEL

DOTT. GIULIO VASSALE

SETTORE

REGGIO NELL' EMILIA

TIPOGRAFIA DI STEFANO CALDERINI E FIGLIO

1892.

Dal Laboratorio Anatomo-Patologico dell' Istituto Psichiatrico di Reggio-Emilia

---

NUOVI METODI D' INDAGINE MICROSCOPICA

PER LO

STUDIO DI ALCUNE PARTICOLARITÀ DI STRUTTURA

DEI CENTRI NERVOSI

DEL

DOTT. GIULIO VASSALE

SETTORE

REGGIO NELL' EMILIA

TIPOGRAFIA DI STEFANO CALDERINI E FIGLIO

1892.

Delle molteplici controversie, che si dibatterono e si dibattono intorno all' intima struttura del sistema nervoso centrale, solo può rendersi ragione chi, desideroso di approfondire le proprie cognizioni su questo difficile argomento, percorre di nuovo, metodicamente, per conto proprio, con pazienza ed amore, le diverse vie (induramento-macerazione nelle soluzioni diluite di bicromato di potassa, di acido cromico, nell'alcool a un terzo; varie impregnazioni metalliche ecc.), che per lo studio di un tessuto così complicato seguirono valenti osservatori, il cui nome è ormai legato alla storia dell' istologia dei centri nervosi.

Questo lavoro, dirò così, retrospettivo richiede lungo tempo; ma è necessario per chi voglia porsi in grado di apprezzare per propria esperienza l' estrema complicatezza di organizzazione del tessuto nervoso centrale, che fece dire a Kölliker che quanto più si perfezioneranno i metodi d' indagine dei centri nervosi, tanto più intricata ne apparirà la struttura. — Venendo poi a completare lo studio del sistema nervoso centrale coi moderni metodi d' indagine, fra i quali senza dubbio il metodo di Golgi, di Weigert (specie colla modificazione di Pal) e di Exner rappresentano le più preziose conquiste, si comprende quante lacune nelle nozioni sull' organizzazione di questo tessuto così complesso esistano

I preparati relativi a questa comunicazione vennero presentati al VII° Congresso della Società Freniatrica tenuto in Milano dal 9 al 12 Settembre 1891.

tuttora; le quali non potranno che difficilmente, dietro insistenti ricerche, venire colmate. E si diventa più che persuasi che per lo studio del sistema nervoso centrale non basta l'uso di un sol metodo d'indagine, ma occorrono metodi molteplici per poter confrontare fra loro i diversi risultati che si ottengono coi singoli metodi, e cercare di mettere in evidenza coll' un processo certe particolarità di struttura che sfuggono coll' altro o si lasciano soltanto intravedere.

Esporrò qui brevemente alcuni metodi d'esame, che io da lungo tempo adopero, e che sono convinto segnino un acquisto vantaggioso nella tecnica microscopica, stando a rappresentare il frutto non inutile di numerosi tentativi da me eseguiti per arrivare a fare spiccare certe particolarità di struttura e a richiamare l'attenzione degli indagatori su date questioni tuttora aperte del sistema nervoso centrale.

Alla breve esposizione dei metodi farò seguire un breve cenno dei resultati che coi singoli metodi ottenni riguardo alla struttura e disposizione dei vari elementi costitutivi dei centri nervosi.

Metodo N. 1. Si prepara il seguente liquido: ad una miscela di 50 parti di liquido di Müller con 50 p. di soluzione acquosa di acido osmico all' 1 % si aggiungono 2 gr. di acetato d'uranio. Si ha così un liquido torbido, che, dopo aver agitato ben bene, si lascia decantare nella boccetta; e si ottiene dopo qualche giorno per tal modo un liquido limpidissimo di un color tendente al giallo, che si conserva benissimo per lungo tempo anche alla luce. L'intorbidamento del liquido non si osserva, e non si nota cambiamento di colore, se si fa prima la soluzione del liquido di Müller coll'acetato d'uranio, e si aggiunge, dopo, la soluzione acquosa di acido osmico; e il liquido preparato in questo secondo modo dà resultati inferiori a quelli che si ottengono col liquido preparato nella prima maniera. — Allestito il liquido suddetto, si procede in questo modo; ossia si fa una miscela di 5 parti di esso liquido con 5 p. di soluzione acquosa di nitrato d'argento all' 1 %, e si aggiunge a questa miscela, a goccie, ammoniaca diluita, finchè si sciolga tutto il precipitato rosso, che si era formato; allora si aggiunge di nuovo, a goccie, soluzione di nitrato d'argento all' 1 %, finchè anche dopo aver agitato ben bene resti una

leggera colorazione rossa alla miscela; da ultimo si filtra la miscela su carta. — Si potrà accanto a questo miscuglio prepararne un altro collė stesse norme, colla sola differenza di non spingere l' aggiunta di nitrato d' argento in secondo tempo fino alla persistenza della colorazione rossa: potrà tale leggera differenza di preparazione della miscela tornare utile per midolli, che da tempo piuttosto lungo si trovino in liquido di Müller.

Nel liquido filtrato si pone un pezzetto di midollo spinale, che abbia subito un indurimento nel liquido di Müller per 40-50 giorni. — Il metodo a volte riesce anche con midolli che siano in liquido di Müller da maggior tempo; ed i resultati, quando la reazione avviene, sono tali che costituiscono di questo processo uno dei migliori mezzi per la dimostrazione di certe particolarità di struttura degli elementi del sistema nervoso centrale, specialmente delle cellule della nevroglia. — Il pezzo di midollo spinale si lascia nel miscuglio sovraccennato per 3-10 giorni; converrà però anche dopo il secondo giorno fare dei saggi, i quali del resto sono presto fatti. Non si ha che a prendere colla pinzetta un po' di sostanza grigia, schiacciarla, coll'aggiunta di una goccia d'acqua distillata, sul portoggetti premendo dolcemente col coproggetti; e fare l' esame ad un forte ingrandimento.

Si vede, quando la reazione è al punto buono, un fitto intreccio di sottili fibre nervose e di fibrille della nevroglia, le prime sono facilmente riconoscibili perchè sono varicose e provviste di guaina mielinica leggermente colorata dall' acido osmico, mentre le fibrille della nevroglia sono molto più sottili ed incolore. Constatata l' avvenuta reazione, che si fa uniformemente su tutto il pezzo, non si ha da far altro che tagliare col rasojo una fetta più o meno spessa di sostanza grigia in senso trasversale o di sostanza bianca in senso longitudinale, e schiacciarla leggermente sul portoggetti col coproggetti, e quindi portare il tessuto schiacciato in una provetta contenente circa 10 cc. di acqua distillata, e fare da ultimo lo scuotimento.

Fatta la sbattitura, si lascia sedimentare il liquido nella provetta stessa; e si prende poscia con una pipetta una goccia del fondo, di cui senz' altro si fa l' esame a forte ingrandimento. — Si hanno per tal modo dei preparati bellissimi, in cui spicca sommamente la differenza fra elementi nervosi e

cellule della nevroglia, le quali appaiono di un' eleganza straordinaria. — Tali preparati si possono conservare abbastanza bene, aggiungendo all' acqua una piccolissima quantità di liquido di Müller, oppure chiudendoli addirittura in una goccia di liquido proprio, ossia della miscela, che ha agito sul pezzo di midollo in questione. Il pezzo si può conservare nella stessa miscela per lungo tempo, senza danno.

Volendo farne sezioni, l' induramento in alcool guasta disgraziatamente quel perfetto differenziamento, che era avvenuto fra cellule della nevroglia ed elementi nervosi, sovratutto circa alla loro struttura: minor danno produce l' indurimento e rischiaramento in una miscela a parti uguali di piridina e trementina, di cui farò parola più sotto.

Però anche in questo modo i preparati di sezioni non sono punto paragonabili ai preparati ottenuti per scuotimento.

Metodo N. 2. Della miscela di liquido di Müller e acido osmico con aggiunta di acetato d' uranio, preparata colle norme indicate nel primo metodo, si prendono parecchi centimetri cubici e si rendono spiccatamente alcalini con aggiunta di ammoniaca a goccie. Il liquido intorbidato dà un precipitato giallo; si filtra su carta; e nel filtrato si pone un pezzo di midollo di vitello ucciso di fresco. Dopo 24-48 ore si fa col rasojo una sezione spessa della sostanza grigia; si schiaccia nel portoggetti esercitando una dolce pressione sul coproggetti; e si fa l' esame nel liquido proprio. — Si vedono bene le cellule gangliari e le numerose fibrille nervose della sostanza grigia del midollo. Questo metodo applicato alla corteccia cerebrale dà risultati analoghi a quello di Exner; ha il vantaggio che anche pezzi relativamente grossi vengano dopo qualche giorno interamente compenetrati dall' acido osmico, mentre col metodo di Exner occorre, come è noto, che i pezzi siano piccoli. — Per far sezioni, però, da trattarsi posteriormente, come consiglia Exner, con ammoniaca, bisogna dopo avvenuta la penetrazione del liquido, assoggettare il pezzo alla fissazione coll'acido formico al 3-5 %; quindi includerlo in gomma, e indurarlo in alcool debole. Le sezioni si possono far rigonfiare, oltre che coll' ammoniaca, anche colla potassa; si possono conservare abbastanza bene in soluzione concentrata di carbonato d' ammoniaca.

Metodo N. 3. Il pezzo viene nello stesso tempo indurito, disidratato e rischiarato in piridina pura. Il primo a parlare dell' uso della piridina in istologia è stato De Souaz [1]. Io non ho potuto leggere che il resoconto della comunicazione del De Souza. Questo Autore raccomanda la piridina per il cervello, specialmente per la dimostrazione dei microrganismi. Io ho fatto molte prove; e posso con sicurezza affermare che i buoni risultati, che dà la piridina per il cervello, non sono neppure lontanamente paragonabili ai risultati addirittura eccellenti, che dà per il midollo spinale. L' induramento in piridina, coi metodi di colorazione che verrò esponendo, rappresenta per il midollo spinale un prezioso metodo d'indagine.

Con un rasoio ben affilato si taglia un pezzo (della lunghezza di 1 cm. circa) di midollo spinale di vitello appena ucciso; e si pone in piridina pura della fabbrica Merk o Schuchart. — La piridina, che deve avere un volume almeno quintuplo del volume della porzione di midollo, in generale dopo 8-12 giorni indurisce, disidrata, e rischiara il pezzo. — Passando allora questo direttamente in xilolo, si pratica l' inclusione in paraffina colle ben note norme. Bisogna aver l' avvertenza di usare paraffina relativamente molle, in modo che il pezzo non abbia a subire temperatura superiore a 50°. Fatta l' inclusione in paraffina, si fanno sottili sezioni trasversali col microtomo. Le sezioni, che si ottengono, sono eminentemente elastiche; e possono, anche sottilissime, subire senza danno tutti gli ulteriori trattamenti.

Liberate dalla paraffina colla trementina, e successivamente dalla trementina col passaggio per qualche istante nell' alcool assoluto, vengono dette sezioni colorite nei modi seguenti:

a) Con fucsina acida alluminata. Ad una soluzione acquosa di allume al 5 %, si aggiunge, a goccie, una soluzione acquosa satura di fucsina acida, finchè si ottenga un liquido di un color rosso piuttosto intenso. Le sezioni si passano dall'alcool in questo liquido, e vi si lasciano per 1-12 ore a seconda del potere maggiore o minore di colorazione, che ha esso liquido in rapporto naturalmente colla maggiore o minor quantità di

[1] De Souza. De la piridine en histologie. *Zeitschr. f. wiss. Mikroskopie.* Bd. V. Heft I.

soluzione acquosa satura di fucsina acida aggiunta prima. Avvenuta la colorazione, le sezioni si lavano per pochi secondi in acqua e quindi in alcool acidulato con acido cloridrico (acido cloridrico 10-15 goccie, alcool 70 cc., acqua distillata 30 cc.); dove, agitate ripetutamente coll'ago, lasciano una nube rossigna. Avviene per tal modo rapidamente una leggera decolorazione, e, facendo seguire il rischiaramento in olio di garofani e la chiusura in balsamo, si hanno dei preparati elegantissimi per ogni riguardo, specialmente poi per la dimostrazione dell' inestricabile intreccio delle fibrille nervose nella sostanza grigia.

b) Con fucsina acida sciolta in una miscela di acido fenico puro con xilolo a parti uguali. Siccome la fucsina in questa miscela a freddo si scioglie difficilmente, converrà fare la soluzione in una provetta a caldo, aggiungendo a parecchi centimetri cubici del miscuglio di fenolo e xilolo poca fucsina acida in polvere e facendo bollire alla fiamma. Anche a caldo la fucsina si scioglie parzialmente; si ottiene un liquido di un color rosso chiaro, nel quale dopo che è raffreddato, si pongono dall' alcool assoluto le sezioni, lasciandovele per 24-48 ore, finchè abbiano preso un color rosso-vivo. Si passano quindi in un vetro da orologio pieno di una miscela di 90 parti di alcool assoluto con 10 parti di ammoniaca, in cui presto si scolorano del tutto: portate allora in un miscuglio di xilolo e acido fenico a parti uguali, tornano di nuovo di un bel color rosso. Se occorre, si possono fare ripetuti passaggi dall' alcool assoluto ammoniacale alla miscela xilolo-fenica, finchè si abbia un' elegante colorazione netta, per lo più sovra tutto del cilindrasse delle fibre nervose. I preparati si chiudono in balsamo di Canadà o damar: per quanto si abbia cura, però, di asciugarli dalla miscela xilolo-fenica, dopo qualche settimana si scolorano. Con questa colorazione si scorge bene d' attorno al cilindrasse colorato un alone incoloro che rappresenta la guaina mielinica.

c) Con ematossilina alluminata secondo la formula di Frey, o con ematossilina glicerinata secondo la formula di Ehrlich [1]. Con quest' ultima ematossilina

[1] V. Behrens. Tabellen zum Gebrauch der mikroskopischen Arbeiten. S. 60-61.

se la colorazione è eccessiva, converrà leggermente decolorare le sezioni passandole in alcool acidulato con acido cloridrico: quindi lavatura prolungata in acqua, passaggio in alcool, e olio di garofani, chiusura in balsamo del Canadà.

Metodo N. 4. Il pezzo di midollo fresco di vitello viene indurito, disidratato e rischiarato in una miscela di xilolo e piridina, oppure di trementina e piridina a parti uguali; e ciò nello spazio di 6-10 giorni. Si fa quindi l'inclusione in paraffina; e le sezioni si colorano coi vari processi esposti nel metodo terzo. — Si mette per tal modo in evidenza, con tutte le varie colorazioni esposte, anche nelle più piccole fibre nervose della sostanza grigia, la guaina mielinica che appare come un alone più o meno incoloro circondante il cilindrasse intensamente colorato.

Metodo N. 5. Il pezzo di midollo di vitello appena ucciso si assoggetta alla fissazione per 12 ore con alcool assoluto, cui si aggiunge solfato di rame in una certa quantità: si passa quindi in piridina pura, dove si lascia per 5-8 giorni. Quanto all' ulteriore trattamento, sezionamento, e colorazione si procede come per il metodo terzo. Coll'accennata colorazione *c*) fatta coll'ematossilina di Ehrlich, e successivo scoloramento in alcool acido viene a spiccare chiaramente nelle sezioni la struttura fibrillare delle cellule gangliari e la differenza fra prolungamenti protoplasmatici, e prolungamento nervoso. — Avendo fatto tentativi anche con altri liquidi fissanti, ho avuto pure buoni resultati dal liquido di Kultschityky, che Wolters [1] pure raccomanda.

Metodo N. 6. Si schiaccia sul portoggetti, premendo col coproggetti, un frammento di sostanza grigia presa da un midollo fresco di vitello; strisciando, si toglie il coproggetti e si essicca la sostanza grigia schiacciata sul portoggetti a moderato calore alla fiamma, come per la dimostrazione dei microorganismi per via secca; si colora quindi, versandovi sopra parecchie goccie di una soluzione acquosa di piridina al 5 % e fucsina basica preparata di fresco nel modo seguente:

[1] Wolters. Drei neue Methoden zur Mark - und Achsencylinderfärbung mittels Hämatoxylin. *Zeitschr. f. wiss. Mikroskopie* V. II. N. 4.

a pochi centimetri cubici di soluzione acquosa di piridina al 5 % si aggiungono 4-6 goccie di soluzione alcoolica satura di fucsina basica, in modo che il liquido prenda un color rosso intenso, pur restando trasparente. — La colorazione si può fare a freddo; o in pochi minuti a caldo, tenendo il portoggetti a moderato calore sopra la fiamma, fino allo svolgersi dei vapori dal liquido colorante. — Avvenuta la colorazione, il preparato si lava con un getto di acqua distillata, e si essicca di nuovo; ciò fatto, si decolora e rischiara nello stesso tempo con olio di garofani, e infine si monta in balsamo del Canadà sciolto in xilolo.

Si potrà, nel caso, aumentare o diminuire il potere di decolorazione dell' olio di garofani, respettivamente acidificandolo leggermente con acido acetico glaciale o aggiungendogli xilolo puro. — Il presente metodo, per la sua sicura e pronta riuscita, si presta benissimo a scopo di dimostrazione nella scuola, per allestire preparati che mettano nella più chiara evidenza la struttura fibrillare delle cellule nervose.

Premessa questa rapida esposizione dei vari metodi, che io da lungo tempo adopero con grande vantaggio per lo studio del sistema nervoso centrale, farò un breve cenno di alcune particolarità, che coll' aiuto di detti processi ho potuto osservare sulla struttura e disposizione dei vari elementi nel midollo spinale. Non ho ancora sufficiente esperienza circa l' applicazione di questi nuovi metodi al cervello. Per alcuni di essi ho già potuto constatare che, volendo applicarli all' indagine del cervello, conviene modificarli alquanto. — In ogni mia ricerca io non ho mai avuto e non ho altro di mira che lo studio della struttura dei centri nervosi da un punto di vista puramente istologico. Io sono convinto che la preoccupazione di molti osservatori di rispondere colle loro ricerche ai dati della fisiologia è stata causa di interpretazioni arbitrarie o suggestive, ed ha certo ostacolato, anzichè agevolare, il progresso in queste investigazioni. Deve l' indagine esser fatta da un punto di vista puramente obbiettivo, trovare cioè mezzi sicuri per apprezzare, in modo che non resti luogo al dubbio, struttura, differenze morfologiche e rapporti fra i vari elementi.

Invero molti indagatori finora corsero dietro all' idea di trovare una connessione diretta e continua fra i singoli elementi per spiegare la trasmissione fra i diversi ordini di fibre; e descrissero molteplici sistemi, che cedettero il posto l' uno all' altro, perchè fondati su interpretazioni che non erano il frutto di un esame dei preparati fatto in modo prettamente obbiettivo e spassionato, indipendentemente da ogni idea della funzione. Oggidì noi sappiamo che la corrente elettrica può trasmettersi senza continuità diretta dei mezzi conduttori; e si comprende quindi come potrebbe anche venir dimostrato erroneo il concetto della continuità diretta fra i singoli elementi, cui informarono le loro ricerche molti indagatori del sistema nervoso centrale.

L' esposizione pertanto, che io sto per far seguire, dei fatti notati coi miei metodi, sarà puramente descrittiva, istologica; fatta naturalmente con quel dovuto riserbo, che si conviene in così difficile argomento e che non può non avere chi, come me, pur continuando in un genere prediletto di studi si decide a pubblicare i risultati finora ottenuti, solo perchè è convinto che fra i metodi esposti ve ne ha qualcuno che mette in evidenza particolarità molto importanti, e ne lascia intravedere altre di non minore entità, dando fondamento a certe questioni, la cui soluzione o con modificazioni dei suddetti metodi, o con processi nuovi deve interessare sommamente gli osservatori.

Nevroglia. Golgi [1] nel suo classico lavoro conchiude che « il tessuto interstiziale è in ogni parte del sistema nervoso centrale essenzialmente formato dalle cellule connettive raggiate e loro prolungamenti. Dall' insieme dei prolungamenti risulta bensì un fitto intreccio, ma non mai un reticolo nel senso di Schultze e Kölliker. Un'altra sostanza interstiziale nel senso stretto della parola all' infuori delle cellule e loro dipendenze crediamo possa essere esclusa o se esiste è certamente in quantità minima ».

Il metodo N. 1 da me esposto permette di poter escludere nel modo più assoluto qualsiasi altro elemento che non sia la

[1] Golgi. Sulla fina anatomia degli organi centrali del sistema nervoso. *Rivista di Freniatria* ecc. Anno VIII-IX-XI.

cellula raggiata nella costituzione dello stroma del midollo spinale nell' uomo. La reazione avviene costantemente e uniformente su tutto il pezzo. Qualunque frammento del midollo, schiacciato modicamente sul portoggetti col coproggetti, lascia vedere in mezzo alle fibre nervose un intreccio fittissimo di fibrille della nevroglia; queste si riconoscono facilmente perchè sono sottilissime, pallide e fortemente splendenti; mentre le fibre nervose sono più grosse, grossolanamente varicose, e colorate più o meno dall' acido osmico.

In un altro punto del citato lavoro Golgi constatando che l' esistenza della cellula raggiata in questi ultimi anni ha avuto la generale conferma degli istologi, osserva, che pochi sono riusciti a riconoscere la sua diffusione, e la parte, che essa prende nella formazione del tessuto interstiziale. E tale osservazione è più che giustificata, in quanto che molti anche oggidì seguitano a distinguere nella nevroglia i nuclei, e le cellule raggiate. Così Mendel [1] in una rassegna fatta all' ultimo Congresso internazionale sull' anatomia patologica della paralisi progressiva, facendo, a proposito della nevroglia, distinzione fra i nuclei (*die Kerne der Nevroglia*) e le cellule raggiate (*Spinnen - oder Pinselzellen*) dice che « *Vermehrung der Kerne der Nevroglia ist ein bei der Paralyse sehr gewöhnliches Vorkomniss;* » e più sotto: « *Ebenso wie die Kerne zeigen die Spinnen - oder Pinselzellen eine oft ganz erstaunliche Vermehrung und Ausdehnung. Die Golgi ' sche Färbung hat uns in dieser Beziehung besonders schöne Bilder geliefert:* » ed attribuisce inoltre ai nuclei della nevroglia diversa origine a seconda della diversa forma, che presentano. Questa erronea distinzione, che molti tuttora fanno, degli elementi della nevroglia si comprende molto facilmente, quando si consideri che i metodi finora raccomandati per lo studio dello stroma dei centri nervosi (induramento-macerazione in soluzione diluitissima di bicromato di potassa al 0,20 0,30 %, in alcool a un terzo; colorazione nera di Golgi) danno risultati molto parziali; di guisa che sono relativamente ben poche le cellule raggiate che con detti metodi si pongono in evidenza, e solo per via di logica induzione si viene ad escludere

[1] Mendel. Die pathologische Anatomie der Dementia paralitica. *Neurol. Centralblatt.* 1890. N. 17.

che null' altro elemento, all' infuori delle cellule aracniformi, costituisca il tessuto interstiziale del sistema nervoso centrale.

L' osservazione invece fatta col mio metodo, per la ragione esposta, convince, *de visu*, del fatto, non lasciando alcun dubbio riguardo allo stroma del midollo spinale nell' uomo.

Quanto alla forma e struttura della cellula raggiata è nota l' opinione di Ranvier ammessa pure recentemente da Weigert [1], secondo cui le cellule della nevroglia non sarebbero altro che lamelle poste nei punti di incrociamento delle fibrille connettive; le quali fibrille non partirebbero dalla cellula e quindi non rappresenterebbero già una emanazione o prolungamenti della cellula stessa, ma non farebbero che attraversarne il corpo o in linea retta o ripiegandosi ad ansa.

Questa descrizione degli elementi della nevroglia fu combattuta da Golgi valendosi, oltre che del bicromato di potassa dello stesso metodo di preparazione del Ranvier (alcool a un terzo). Col mio metodo suaccennato nei preparati ottenuti prendendo colla pipetta una goccia del fondo della provetta, dove si è fatto lo scuotimento, si vedono isolate un numero grandissimo di cellule della nevroglia, che appaiono addirittura elegantissime, corrispondenti pienamente al tipo della cellula aracniforme descritta da Deiters e da Golgi. Si vede cioè distintissimo un nucleo di varia forma e grossezza, ed un corpo protoplasmatico cellulare, che manda spesso prolungamenti, le cui ramificazioni si continuano in lunghe fibrille. Mentre i prolungamenti, nel distaccarsi dalla cellula spesso suddivisi, sono appiattiti ed hanno un aspetto protoplasmatico granuloso, i sottili filamenti, che partono dai medesimi, hanno un aspetto omogeneo; sono fortemente splendenti e di quando in quando presentano, nel loro lungo decorso, dei rigonfiamenti, quasi dilatazioni varicose; spiccano, oltre che per la loro estrema sottigliezza, perchè sono del tutto incolori, non essendo punto colorati dall' acido osmico e venendo per giunta, per effetto della reazione, anche privati della colorazione data dal liquido di Müller. Che del resto la proposta miscela tolga la colorazione del bicromato di potassa dal connettivo, si vede anche macroscopicamente nel pezzo, poichè,

[1] C. Weigert. Bermerkungen über das Neurogliegerüst des menschlichen Centralnervensystems. *Anat. Anz.*, Jahrg. V, 1890, N. 19.

poco dopo, le pie meningi appaiono biancastre, mentre il resto prende un colorito rosso-mattone.

Rapporto delle cellule della nevroglia col tessuto circostante. — Quanto alle connessioni intime degli elementi della nevroglia colle pareti vasali, i fatti descritti da Golgi spiccano nel modo più evidente. Una siepe di fibrille circonda i vasi; in alcuni vasi si scorge alla periferia una serie di cellule raggiate, dal cui corpo partono numerosissimi prolungamenti. — Riguardo al rapporto delle fibrille della nevroglia colle fibre nervose, Paladino[1] recentemente, valendosi di un suo speciale metodo d'indagine (reazione del cloruro di palladio con joduro di potassio), considerava la questione sotto un aspetto nuovo. Lo scheletro neurocheratinico della fibra nervosa non sarebbe che una continuazione delle fibrille della nevroglia. Io ho fatto uso parecchie volte del metodo di Paladino, ed ho potuto persuadermi che detto metodo può in realtà condurre a resultati importanti sulla struttura dei centri nervosi. Nei tentativi fatti, però non molto numerosi, non sono riuscito ad ottenere preparati veramente dimostrativi, da cui risultassero chiaramente le particolarità in questione descritte dall' A. nella sua Comunicazione.

Ho però, guidato dall' idea di Paladino, praticato un esame accurato di molti preparati fatti col mio metodo, che per la dimostrazione della nevroglia sono convinto rappresenti un vero progresso nella tecnica microscopica; e parecchie volte in preparati fatti di fresco ho pututo coi migliori obbiettivi (immersione omogenea $^1/_{12}$ di Zeiss) vedere delle fibrille lunghe, dello stesso aspetto di quelle della nevroglia, uscire dall' interno di un frammento di guaina mielinica. — Disgraziatamente, come ho accennato, i pezzi trattati col mio metodo, se danno preparati elegantissimi per scuotimento, passati in alcool, per esser induriti e quindi colle norme solite inclusi in celloidina o in paraffina e sezionati, danno preparati, che rispetto alla struttura fibrillare della nevroglia perdono molto della loro chiarezza.

[1] Paladino. Di un nuovo processo per le indagini microscopiche del sistema nervoso centrale. (Estratto dal *Rend. della R. Accad. delle Scienze Fisiche e Matematiche.* Fasc. I. Gennaio 1890. Napoli).

Finora non sono riuscito a trovare un metodo d' induramento, che soddisfaccia pienamente in proposito. Assoggettando il pezzo, dopo avvenuta la reazione da me indicata, all' induramento e contemporanea disidratazione e rischiaramento in una miscela di piridina e trementina a parti uguali (metodo N. 5, che ho sperimentato il migliore per conservare abbastanza bene la struttura fibrillare della cellula raggiata nei pezzi dove sia avvenuta la reazione anzidetta), e facendone poscia sottili sezioni longitudinali in paraffina, si vedono nella sostanza bianca le fibrille della nevroglia costituire un intreccio fitto dattorno alle fibre nervose; e in preparati trattati col cloroformio a caldo si ha l' illusione che arrivino sino al cilindrasse, venendo per tal modo, come dice Paladino, a costituire una continuità diretta collo scheletro neurocheratinico della guaina mielinica.

Di questo fatto, però, malgrado l' osservazione con fini obbiettivi, non si acquista la certezza. — Tutto considerato, dallo studio accurato della nevroglia fatto col mio metodo, il dubbio, che il rapporto fra tessuto interstiziale e fibra nervosa sia quale vorrebbe Paladino, nasce fondato, ed io mi unisco volentieri a questo A. per richiamare sopra una così importante questione l' attenzione degli osservatori. — Dei rapporti della nevroglia colle cellule nervose, dirò più sotto, parlando delle cellule gangliari.

Qui voglio far menzione di un fatto, che è molto importante per la teoria della colorazione nera di Golgi. I preparati ottenuti col mio metodo N. 1 si possono trattare in modo da assistere al microscopio in pochi giorni, coll' esame ripetuto, all' effettuarsi di una colorazione nera alla Golgi. I preparati fatti collo scuotimento dei frammenti dei pezzi trattati col mio liquido, elegantissimi esaminati a fresco nell' acqua di sbattitura, si conservano, come ho accennato nella descrizione del metodo, sempre molto dimostrativi, aggiungendo alla goccia del sedimento sul portoggetti, con un bastoncino di vetro, un po' di liquido di Müller, o di liquido proprio, dove cioè è avvenuta la reazione del pezzo. Nei numerosi tentativi fatti per trovare un liquido, in cui si potessero chiudere e conservare i preparati eleganti come allo stato di freschezza, mi fu dato di trovarne uno, che appunto in 6-10 giorni trasforma la cellula della nevroglia del mio metodo nella cellula della nevroglia, quale apparisce col metodo di Golgi.

Questo liquido si prepara nel modo seguente: in 100 centimetri cubici di liquido di Müller si sciolgono a caldo 3 gr. di acetato d'uranio; si lascia raffreddare la soluzione e si filtra; si fa un miscuglio di cinque parti del liquido filtrato con 5 p. di una soluzione di nitrato d'argento all'1 %; si versa ammoniaca diluita fino a soluzione del precipitato rosso; si aggiunge di nuovo soluzione di nitrato all'1 % fino alla persistenza della colorazione rossa nel liquido; il quale viene da ultimo filtrato su carta. I preparati chiusi in questo miscuglio, vanno in pochi giorni, specialmente per le cellule della nevroglia, assumendo una colorazione giallo-scura, che gradatamente diventa nera, simile a quella di Golgi, senza che si formi alcun precipitato.

Riguardo alla teoria della colorazione nera di Golgi è nota l'opinione di Rossbach e Sehrwald [1], secondo cui colla reazione nera non si colorano già le cellule nervose e della nevroglia, ma si ha solo un'incrostazione degli spazi linfatici dattorno alle cellule e ai loro prolungamenti; di guisa che i più fini ramuscoli, che con questo metodo si mettono in evidenza, abbiano ad avere il significato, anzi che di vere ramificazioni, di vie linfatiche efferenti od afferenti allo spazio pericellulare. Questa interpretazione fu già combattuta dal dott. Belmondo [2] coll'esame accurato, fatto in questo Laboratorio, di sottilissime sezioni in serie della corteccia cerebrale, praticate in senso parallelo alla superficie cerebrale.

Che una simile interpretazione del resto sia assolutamente erronea, apparisce chiaramente da ciò, che ho sopra esposto.

Cellule nervose. La struttura fibrillare delle cellule nervose, accennata da Remack e accuratamente descritta da Schultze, spicca colla massima evidenza coi metodi da me esposti N. 5 e N. 6. La struttura fibrillare è non solo propria della parte periferica della cellula; ma di tutto il corpo della cellula, all'infuori del nucleo. In qualunque punto della cellula nervosa cada la sezione (metodo N. 5), tale struttura fibrillare è spiccatissima, e si vede continuare coi prolungamenti

[1] Rossbach u. Sehrwald. Ueber die Limphwege des Gehirns. *Centralblatt f. d. medic. Wissenschaften* Nr. 25 u. 26. 1888.

[2] Belmondo. Sulla teoria della colorazione nera di Golgi. *Rivista sperimentale di Freniatria ecc.* Vol. XIV. Fasc. III.-IV. 1888.

protoplasmatici. Fra le fibrille esiste una sostanza finamente granulosa; e questa sostanza rappresenta la parte acromatica delle cellule nervose, mentre le fibrille rappresentano la parte cromatica. Infatti restano benissimo colorate nelle sezioni dei pezzi trattati col metodo N. 5, in cui si faccia la colorazione coll' ematossilina di Ehrlich, o colla fucsina acida alluminata, e la decolorazione successiva coll' alcool cloridrico. Col metodo N. 6 appaiono appunto di una grande eleganza, perchè l' olio di garofani, togliendo la colorazione della fucsina dalla parte granulosa, rischiara e lascia intensamente colorata la parte fibrillare della cellula. — Le fibrille, mentre si vedono direttamente continuarsi nei prolungamenti protoplasmatici dando a questi lo stesso aspetto del corpo cellulare, non si vedono continuare nel prolungamento nervoso; il quale perciò appare liscio, di aspetto jalino, assottigliantesi a cono, presenta cioè evidenti tutti i caratteri noti, riuscendo per tal modo a prima vista distinguibile. Non si può, però, constatare la sua connessione col nucleo; mentre nei preparati fatti col citato metodo di Paladino, per qualche rara cellula nervosa, di questo fatto si acquista la convinzione. — Per il fatto che col metodo N. 5 di regola solo il prolungamento del cilindrasse appare sfornito di struttura fibrillare, e che nell' esame di molte sezioni si trova qualche rara cellula nervosa, che fra i vari prolungamenti ne presenta due di aspetto più o meno ugualmente jalino e di forma più o meno ugualmente conica, verrebbe a prendere valore l' osservazione di Schiefferdecker e di altri, che cioè esistano cellule gangliari con due prolungamenti nervosi. Questo fatto, che se fosse posto fuori di dubbio, avrebbe somma importanza, mi riserbo di vedere se può esser confermato e più chiaramente dimostrato con altri metodi, dattorno ai quali sto presentemente lavorando.

Se nei preparati fatti col metodo N. 5 si vede che, già al suo staccarsi dal corpo cellulare il prolungamento del cilindrasse è privo della struttura fibrillare, non si può dire che si veda la stessa cosa col metodo N. 6. Ho già detto che quest'ultimo metodo per la rapidità e sicurezza di riuscita si presta molto per le dimostrazioni nella scuola. Or bene nei preparati allestiti con questo processo si nota che anche il prolungamento nervoso nel suo distaccarsi dal corpo cellulare presenta struttura fibrillare, la quale però cessa a breve distanza dalla

cellula; mentre nei prolungamenti protoplasmatici tale struttura fibrillare si segue per lunghissimo tratto del loro decorso, anche a molta distanza dal corpo cellulare. E in vero con questo metodo i prolungamenti protoplasmatici ci appaiono di una lunghezza tale da far subito comprendere quanto sia difficile, se non impossibile, seguirli nelle sezioni. L' intreccio loro poi è complicatissimo; non si riesce però a vedere anastomosi, se si eccettua qualche raro tratto protoplasmatico che a guisa di grosso ponte, solo per via eccezionale, unisce due cellule vicine.

Preteso spazio pericellulare. Sono pienamente convinto con Fromman, Golgi, Axel Key e Retzius, che lo spazio pericellulare sia un prodotto artificiale. La convinzione, che in senso contrario dice di avere Paladino, non può certamente derivare dall' applicazione del suo metodo. Egli tratta con cloruro di palladio e joduro di potassio pezzi, che sono già stati induriti nel sublimato, nel bicromato di potassio, o nell'acido cromico, in cui quindi detto spazio era preformato. — Bisogna quindi che egli si basi sulle osservazioni, tutt' altro che dimostrative, fatte a questo proposito dai sostenitori dello spazio perigangliare. Con nessuno dei miei metodi di induramento N. 3 e N. 4 si scorge la più piccola traccia di questo spazio. E non è a dire che non si vegga spazio perigangliare, perchè il liquido indurante abbia spinto il tessuto circostante contro le cellule nervose. Le sezioni dei pezzi induriti coi due metodi sovraindicati, messe nella miscela, per la colorazione *c)*, di xilolo e fenolo a parti uguali, si rigonfiano considerevolmente e distendono, acquistando un diametro per lo meno uguale a quello del pezzo fresco; e pure anche facendo l'esame nella stessa miscela, che le mantiene distese, non si riesce mai a vedere spazio pericellulare. Si vede invece tanto dattorno al corpo cellulare, come dattorno ai prolungamenti un infinito numero di minute fibre che riescono colorate sia colla fucsina acida, come coll' ematossilina alluminata.

Quanto alla natura di queste minute fibre non esito a ritenere che siano di natura nervosa, perchè i metodi N. 3 e 4 non sono adattati per la dimostrazione delle fibrille della nevroglia. Infatti con questi due metodi la zona di tessuto, privo di elementi nervosi, circondante perifericamente il

midollo, come pure lo strato di tessuto circostante all'epitelio del canale centrale, presentano una struttura pressochè granulosa con nuclei. E col metodo N. 1 possiamo constatare, ciò che del resto è noto, che questi due punti del midollo risultano di pura nevroglia: e che anzi nella zona periferica, si riscontrano, conformemente all' osservazione già fatta da Golgi, cellule raggiate più robuste, a fibrille molto più grosse, di quello che non siano nella sostanza grigia. Se adunque coi metodi N. 3 e 4 non si pongono in evidenza le fibrille delle cellule della nevroglia, le minute fibre dattorno alle cellule gangliari, messe in evidenza con questi metodi, non possono essere che di natura nervosa. Infatti col metodo N. 3, colorazione *b*) e col metodo N. 4 spicca anche dattorno a queste minute fibre circondanti le cellule gangliari un alone rappresentante la guaina mielinica. Del resto anche col metodo Pal, quando riesce bene, si vede dattorno alle cellule nervose una fitta siepe di fibre nervose; soltanto non si vedono con questo metodo far capo, ossia essere in intimo contatto colle cellule gangliari, perchè il metodo Pal viene fatto su pezzi induriti in bicromato di potassio, in cui si preformano ampi spazi pericellulari. Coi metodi da me esposti questi spazi non si producono, e perciò le fibre nervose si vedono ad intimo contatto colle cellule nervose.

Circa alla natura di questo stretto rapporto di contatto, col metodo N. 3, colorazione *a*) e *c*), alcune fibre sembrerebbero addirittura impiantarsi nella cellula gangliare; e la stessa impressione si avrebbe anche col metodo N. 2, che fa spiccare benissimo questo intreccio di fibre nervose midollate, colorite in questo caso dall' acido osmico, che circondano strettamente la cellula nervosa: ma nulla di sicuro si può affermare.

Riguardo poi al rapporto delle cellule gangliari con quelle della nevroglia io ammetto volentieri con Paladino che fibrille della nevroglia facciano capo al corpo ed ai prolungamenti della cellula nervosa. Tengo preparati fatti colla reazione del cloruro di palladio con ioduro di potassio, nei quali si vedono filamenti, che avrebbero l' aspetto di essere della nevroglia e che attraversando il preteso spazio pericellulare vanno alla cellula nervosa. — Ma più che da questi preparati, sono indotto da ammettere detto rapporto per la seguente semplice considerazione. Senza dubbio tutte le

cellule della nevroglia, ossia i così detti nuclei della nevroglia sono cellule raggiate, i cui prolungamenti ordinariamente sono diretti in tutti i sensi dattorno al corpo della cellula stessa. Ora siccome dattorno alle cellule gangliari nelle sezioni fatte col metodo N. 3, colorazione *a)* e *c)*, si osserva sempre una corona di nuclei evidentemente della nevroglia, alcuni dei quali sono strettamente applicati al corpo della cellula nervosa, non si può non supporre, che queste cellule raggiate che mandano fibrille in tutti i sensi, non ne mandino anche al corpo e ai prolungamenti della cellula nervosa. Disgraziatamente il metodo N. 1, che per le cellule isolate della nevroglia dà così splendidi risultati, di cellule nervose isolate ce ne mostra poche e mutilate, poichè la maggior parte restano coinvolte in un amalgama di fibre, che le ricopre. E il difetto di darci cellule nervose molto mutilate è di tutti i metodi finora raccomandati per l' isolamento delle cellule gangliari. A trovare perciò un metodo, che soddisfaccia a questo riguardo, devono mirare gli sforzi degli indagatori. Solo allora potrà la questione della cellula gangliare avviarsi per via sicura alla sua soluzione. Così alcuni miei preparati (metodo N. 5, fissazione in alcool assoluto e solfato di rame), lasciano intravedere un rapporto delle fibrille del corpo cellulare gangliare col tessuto ambiente; ma sulla natura di questo rapporto nulla posso asserire, se cioè sia colle fibrille della nevroglia o colle fibrille del cilindrasse delle fibre nervose, che circondano e fanno capo alla cellula nervosa.

F i b r e n e r v o s e. Coll' uso dei miei metodi le fibre, che appaiono s i c u r a m e n t e di natura nervosa, s o n o t u t t e m i d o l l a t e. La guaina mielinica è più o meno sottile, a volte esilissima, ma esiste sempre. Ciò apparisce chiaro col metodo N. 1, 2, 3 (colorazione *c)*, e N. 4. Nei preparati fatti per schiacciamento o dilacerazione col metodo N. 1 risulta come ho accennato, nella descrizione del processo, un fitto intreccio di fibrille della nevroglia e di fibre nervose. Queste appaiono g r o s s o l a n a m e n t e v a r i c o s e, presentano una guaina più o meno sottile, periferica, colorita dall' acido osmico, e al centro una sostanza protoplasmatica (il cilindrasse) non colorata dall'acido osmico, colorata invece spesso d'una leggera tinta rosea per la riduzione del sale d' argento. Le varicosità sono rappresentate come da ammassi protoplasmatici quasi nucleari,

anch' essi a tinta rosea, posti a tratti di distanza più o meno regolari lungo il cilindrasse.

Se tali varicosità, che sono costanti, rappresentino un prodotto artificiale, o stiano ad indicare qualche cosa di normale nella struttura della fibra nervosa, non posso dire. Noterò a questo proposito come nel campo dell' anatomia patologica siano state descritte in varie malattie, come alterate fibre nervose della corteccia cerebrale e della sostanza grigia del midollo spinale, perchè con dati metodi, per es. col metodo di Adamkiewicz, apparivano varicose. Non si può dare certamente importanza dal lato anatomo-patologico a questo fatto, che con detto mio metodo, che per lo studio del sistema nervoso centrale presta eccellenti servigi, si riscontra costantemente e in tale aspetto da destare il dubbio che si tratti di una particolarità normale di struttura.

Ritornando alla questione della guaina mielinica propria alle più minute fibre nervose della sostanza grigia, pure i preparati fatti col metodo N. 4, colorati coll' ematossilina di Ehrlich e colla fucsina acida alluminata ci mostrano la cosa in modo evidente. Nei corni posteriori si hanno fibre nervose più piccole di tutte le altre della sostanza grigia del midollo spinale. Or bene nelle sezioni trasversali di midollo fatte coll' accennato processo si vedono i cilindrassi di queste sottilissime fibre in sezione ottica chiaramente circondati da una guaina che potrà apparire del tutto incolora, o meno, a seconda del grado, a cui si è spinto la decolorazione coll' alcool cloridrico. Mi si potrà obbiettare che se appaiono tutte midollate le fibre nervose dimostrabili coi miei metodi, ciò non toglie che ne possono esistere di amidollate. Bisogna però considerare che coi miei metodi appaiono midollate fibre di un diametro di poco o appena superiore a quello delle fibrille della nevroglia. Ora con altri metodi per es. impregnazioni metalliche che colorino uniformemente fibrille della nevroglia e nervose, non solo non si può negare assolutamente alle più minute fibrille nervose la guaina mielinica, ma riesce abbastanza difficile riconoscere sicuramente date fibrille di natura nervosa, essendo così intimo il rapporto tra fibrille della nevroglia ed elementi nervosi, e non potendo la grossezza e la forma varicosa, proprie anche delle fibrille connettive, essere prese come criterio sicuro di giudizio differenziale. Coi miei

metodi poi, anche in sezioni dello spessore di 2-5 μ., l'intreccio delle fibrille nervose midollate è tale da costituire un fittissimo feltro. Quindi, pur non negando assolutamente la presenza di fibre amidollate nella sostanza grigia del midollo spinale, mi pare che noi potremo con sicurezza ammetterne l'esistenza solo quando saranno trovati metodi che pur mettendo in evidenza nelle minute fibrille nervose l'esistenza della guaina mielinica ci rivelino nello stesso tempo fibrille nervose più minute ancora, sfornite di questa guaina, nettamente distinguibili per diversa forma o colorazione dalle fibrille della nevroglia.

Quanto alle ramificazioni delle fibre nervose della sostanza grigia, Exner dice di non aver mai col suo metodo potuto vedere divisione di sorta delle fibre della corteccia cerebrale. Infatti col metodo Exner le minute fibre nervose della sostanza grigia cerebrale appaiono sempre semplici.

Pure col mio metodo N. 1 in molti preparati fatti di sedimento della sbattitura non ho io mai potuto vedere una vera ramificazione di fibre nervose. Ho notato più volte ad una minutissima fibra nervosa venire in un dato punto ad accollarsi un'altra fibra nervosa dello stesso calibro. Quest'ultima nel punto, in cui si giustapponeva alla prima, era assottigliata quasi a cuneo: di modo che a debole ingrandimento si aveva l'impressione di una vera ramificazione; a forte ingrandimento invece si constatava non trattarsi che di una semplice giustapposizione delle due fibre nervose in quel punto.

Non mancherò di insistere in modificazioni di questo mio processo col quale si dovrebbe arrivare a dare la più sicura conferma, in preparati per isolamento, del fatto importantissimo della ramificazione delle fibre nervose, che a Golgi e ad altri eminenti osservatori (Kölliker) che hanno lavorato col suo metodo, è risultato chiaramente.

Quanto alle particolarità di struttura del midollo spinale, rilevabili con alcuni dei miei metodi rispetto al decorso delle fibre nervose nel midollo, esse formeranno oggetto di un' altra mia comunicazione.

Per ora mi limito a notare come coi metodi N. 3 e N. 4 si vede chiaramente nelle sezioni trasversali, conformemente a ciò che descrive Golgi nell' ultima sua comunicazione [1],

[1] Golgi. La rete nervosa diffusa degli organi centrali del sistema nervoso. Suo significato fisiologico. *Rendic. del R. Istituto Lombardo di Scienze e Lettere.* Vol. XXIV. Fasc. VIII e IX 1891.

che da quel fittissimo e complicatissimo intreccio di fibre nervose, che costituisce per così grande parte la sostanza grigia, si irradiano in tutti i sensi fibre nervose di vario diametro e penetrano nella sostanza bianca. Bisogna notare però che queste fibre irradiantisi dalla sostanza grigia, all'infuori naturalmente delle radici anteriori e posteriori, non arrivano mai sino alla periferia del midollo, ma si arrestano la maggior parte circa ai due terzi dello spessore della sostanza bianca.

Un altro fatto, sovra cui voglio richiamare l'attenzione degli osservatori, è la struttura dei corni posteriori. Mentre nei corni anteriori e laterali e nel mezzo della sostanza grigia le fibre nervose decorrono in tutti i sensi, di calibro molto diverso fra loro, costituendo un inestricabile intreccio; nei corni posteriori questo così complicato intreccio manca; le fibre sono si può dire tutte di uno stesso diametro, molto piccole, e decorrono in due sensi, trasversale e longitudinale; di guisa che trasversalmente si vedono fascetti raggiati, ossia fascetti radicolari, che limitano dei segmenti, che coll'ordinaria colorazione al carmino appaiono costituiti da masse granulari sparse di nuclei, e che invece col mio metodo N. 4 risultano di tante fibre nervose dello stesso calibro, evidentemente midollate, sezionate tutte trasversalmente. Simili fibre collo stesso decorso entrano pure per buona parte nella costituzione della sostanza gelatinosa di Rolando.

Sicchè si può affermare che i corni posteriori siano per la massima parte (fatta naturalmente astrazione delle cellule nervose e della nevroglia e dei fascetti radicolari) costituiti da fibre nervose midollate minutissime, tutte di uno stesso diametro, decorrenti sempre in senso longitudinale, come risulta dall'esame di sezioni trasversali praticate a diverse altezze del midollo spinale.

Continuando i miei studi sull'organizzazione del sistema nervoso centrale mi riserbo di illustrare con figure in altro mio lavoro molte delle particolarità accennate; nessuna delle quali ho affermato che non risulti da preparati chiaramente dimostrativi, di cui io non sia in possesso. Del resto i metodi sopra descritti sono in generale, ad eccezione del primo, di così regolare riuscita che sono convinto ogni osservatore potrà, dopo non lunga applicazione dei medesimi, aver piena dimostrazione dei risultati, che ho brevemente esposti.

ANNO 1892.